

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PRODUCTION OF beta-AMYLASE

Patenttinumero: JP63079590  
Julkaisupäivä: 1988-04-09  
Keksijä(t): KATAYAMA MAKOTO, others: 02  
Hakija(t): GLYCO EIYOU SHOKUHN KK  
Pyydetty patentti: ☐ JP63079590  
Hakemusnumero: JP19860226499 19860924  
Prioriteettinumero(t):  
IPC-luokitus: C12N9/26  
EC-luokitus:  
Vastineet:

### Tiivistelmä

**PURPOSE:** To produce the titled enzyme inexpensively and efficiently, by adjusting wheat flour or undenatured raw gluten fractionated from the wheat flour to a proper pH, dispersing, treating the dispersion with protease or not and using the dispersion or further purifying.

**CONSTITUTION:** Undenatured gluten is blended with a buffer solution of acetic acid, lactic acid, etc., adjusted to pH 4.5-5 and dispersed. In the operation, addition of sodium hydrogensulfite, etc., reduces viscosity of the gluten. After the dispersing the over, the dispersion is directly dried or part of the solution subjected to salting-out is partially collected or pH of the dispersion is simply returned to 7, only the solution part is partially collected and the collected solution is properly treated by ultrafiltration concentration, vacuum drying, spray drying, etc., to give the aimed enzyme. Or, the undenatured gluten is dispersed and then treated with acidic neutral protease to give the enzyme. Further wheat flour is blended with five times as much as water, the suspension is directly treated with protease or with three times as much as water, adjusted to pH 4.5-4.8 and treated with protease or not so that the aimed enzyme can be obtained.

Tiedot otettu esp@cenet:in tietokannasta - 12

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-79590

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月9日

C 12 N 9/26

7823-4B

審査請求 有 発明の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称  $\beta$ -アミラーゼを製造する方法

⑯ 特 願 昭61-226499

⑰ 出 願 昭61(1986)9月24日

⑱ 発 明 者	片 山 誠	京都府相楽郡山城町平尾中川原7-4
⑱ 発 明 者	村 山 武	滋賀県大津市田上稲津町182-9
⑱ 発 明 者	尾 上 旦	大阪府池田市畑4丁目11番4号
⑲ 出 願 人	グリコ栄養食品株式会社	大阪府大阪市福島区海老江1-13-4

明 細 書

1. 発明の名称

$\beta$ -アミラーゼを製造する方法

2. 特許請求の範囲

- ① 小麦粉から分別された未変性のグルテンを、それに含有されている $\beta$ -アミラーゼの酵素活性が失活しない範囲においてpHを調整することにより分散させ、必要に応じてこれをそのまま又は水溶性区分のみを分取することを特徴とする $\beta$ -アミラーゼを製造する方法。
- ② 小麦粉から分別された未変性のグルテンを、必要に応じてそれに含有されている $\beta$ -アミラーゼの酵素活性が失活しない範囲においてpHを調整することにより分散させたのち、プロテアーゼを作用させることを特徴とする $\beta$ -アミラーゼを製造する方法。
- ③ 小麦粉に加水して得られる懸濁液を、それに含有されている $\beta$ -アミラーゼの酵素活性が失活しない範囲においてpHを調整して小

麦粉中のグルテンを分散させたのち、これを遠心分離により沈殿物を除去するか又はしないで、必要に応じてプロテアーゼを作用させることを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

① 産業上の利用分野

本発明は、小麦粉又はそれから分別した未変性の生グルテン区分をそのまま又は分散させた上、プロテアーゼを作用させ又はさせないでそのまま、もしくは更に精製するなどにより、液体又は粉末状の $\beta$ -アミラーゼを製造することにある。

② 従来技術及びその問題点

現在、 $\alpha$ -アミラーゼを含まない $\beta$ -アミラーゼの酵素剤として市販されているものは、大豆分離蛋白質製造時の廃液を限外ろ過濃縮した後、そのままもしくは塩析して精製し、これを液体又は粉末として製品化したものが殆んどである。

しかし、上記廃液中の $\beta$ -アミラーゼ力価

(力価測定法については末尾記載の注を参照されたい)は20単位/μ程度であり、これを原料として高力価製品(通常、2000単位/μ程度以上のものをいう)を製造するには力価がひくすぎて膨大な干渉面積を有する限外濃縮機が必要であり、製造設備及びランニングコストが高い等の問題点があった。

### ③ 問題点を解決するための手段

本発明者等は、小麦粉を分別して得られる小麦グルテン区分が高力価のβ-アミラーゼ活性を有すること及び小麦粉にプロテアーゼを作用させるとβ-アミラーゼ力価が約2倍に上昇することを発見した。このことは従来全く知られていなかった新しい事実である。そこで、この事実に基づき、小麦グルテンをpH 3.8～7.8の範囲で分散後そのまま粉末化するか、又は生グルテンもしくは小麦粉そのものをプロテアーゼで処理して得られる水可溶部をそのままあるいは更に精製する等、鋭意工夫して本発明を完成させたものである。

から4～5.5程度に下げる必要がある。もっとも、第2発明、第3発明においては、場合によってはpH調整を必要としないときもある。pH調整のためには、通常、酢酸、乳酸等の他適宜な緩衝液を加えればよい。

未変性グルテンを酸性で分散するとき、亜硫酸水素ナトリウムの如き亜硫酸塩を加えるとグルテンのS-S結合を切断して分散液の粘度を下げるので、それでもって通常の粘度範囲になるまで分散液の固型分濃度を上げることができ、作業性、経済性を改善することができる。

第1発明ではかかるグルテン分散後そのまま乾燥してもよいし、又は、更に精製してもよい。精製するには、たとえば食塩、硫酸、リン酸塩の如きを溶解して塩析し、溶解部分を分取するか、又は単にかかる分散液のpHを再び7付近にもどして液部のみを分取するとかによればよい。このようにして分取されたものは、限外濃縮機、真空乾燥、噴霧乾

本発明で採用する小麦粉は、格別なものではなく、グルテン含量、小麦粉の市価などにより適宜選択される。また、ここでいう未変性グルテンとは、加熱変性をうけていないものであって、pHがおよそ4以下又は8以上になるような処理を受けていないものをいう。

β-アミラーゼが失活しない安定領域がpH およそ3.8～7.8であるから以後の処理においてもこのpH領域又は好ましくはpH 4.0～7.5を外れないようにすることが肝要である。

第1発明(特許請求の範囲の①に記載の発明を第1発明、同範囲の②に記載の発明を第2発明、同範囲の③に記載の発明を第3発明という。以下同じ)から第3発明にかけて共通にいえることは、未変性グルテンを充分分散させるか又はβ-アミラーゼの酵素活性が失活しない条件で加水分解することが大切である、ということである。充分に分散するためには、グルテンの等電点であるpH 7付近

燥等の適宜の処理を経て製品化されることとなる。かかる精製法は第2～3発明においても同様に採用することができる。

本発明で使用するプロテアーゼは、酸～中性プロテアーゼであればよく、特定なものには限らない。加水分解の程度についても特に限定はないが分解の程度がひくければβ-アミラーゼ力価が余り向上しないし、逆に分解度が高いと可溶化が進み最終製品に水可溶性ペプチドが不純物としてくる量が大きくなる。もっともこの場合は、可溶区分を分取し限外濃縮機とか硫酸等による塩析によって精製することにより最終製品のβ-アミラーゼ力価をあげることが出来る。しかし精製工程を経ないときは、力価向上と可溶化の程度を調べながら適宜に作用させ可溶化するとよい。最終製品から使用したプロテアーゼを除去する必要があるときは、安定域のせまいプロテアーゼを使用し、グルテン分解後、液のpHをその安定域外に変更することによって

プロテアーゼのみ不活性化するなどが考えられる。

第3発明においては、たとえば、小麦粉に2倍以上（好ましくは5倍）の水を加え、得られた懸濁液に直接プロテアーゼを作用させ、小麦粉中のグルテンを充分分解してからそのままもしくは遠心分離で水不溶分を除去したのち、乾燥するか又は更に限外圧過濃縮とか硫酸等による塩析によって精製後乾燥する。又他の方法としては、たとえば、小麦粉に3倍の水を加え、酢酸、乳酸等でpH 4.5～4.8とし分散し遠心分離で水不溶部を除去した後、可溶部を分取し、それをそのまま乾燥するかあるいは更にプロテアーゼを作用させグルテンを充分分解してからそのままもしくは圧過したのち乾燥するか又は更に限外濃縮とか硫酸等による塩析によって精製後乾燥する。

硫酸で処理する場合、硫酸濃度を段階的に変えて比でん物を分取し精製度合をたかめることもできる。

タイプの $\beta$ -アミラーゼと小麦グルテンと結合した非水溶性タイプの $\beta$ -アミラーゼが存在するのか、又はその他何らかの理由でグルテンにより $\beta$ -アミラーゼ活性が阻害されていることを推察させるものである。従って、単にグルテンを水で洗ってもアミラーゼ力価は出ない。グルテンを分散させ、又は加水分解して初めてグルテンにより阻害されていたアミラーゼ活性が顕在化し、力価が向上する。

たとえば、小麦粒位の糊粉層付近から分別されたいわゆるマルシー粉（丸C粉、たとえば日清製粉株式会社製の青銀杏など）に含まれている $\beta$ -アミラーゼの力価は約200単位/ｇであるが、これにプロテアーゼを作用させると約2倍の400単位/ｇであったし、この小麦粉から分別した生グルテンをpH調整して適宜分散させた後噴霧乾燥したものは、グルテンを分解したわけでもなく単に分散させただけのものであるにもかかわらず、実に約1,400単位/ｇという高力価を示した。こ

プロテアーゼを作用させるについてはpHや温度をどのようにするか、作用時間中の発酵・腐敗を防止するため、低濃度のアルコール、プロピレングリコール等を加えとか、食塩その他殺菌性、静菌効果のある物質を添加することもある。

#### ④ 作用及び効果

通常市販されている未変性グルテンには $\beta$ -アミラーゼ活性が殆んどみられないため、従来はグルテンには $\beta$ -アミラーゼ活性はないと思われていた。しかし、これは生グルテンを活性グルテン粉末として製品化する工程で、アンモニア水を加えてpH 10付近にするため酵素が失活したものであろうと推定される。本発明ではかかる高pH処理をうけていない未変性グルテンには $\beta$ -アミラーゼ活性があり、かつ、グルテンを加水分解すればその力価が向上することを発見したのは、先述の通りである。

そして、この現象は、小麦粉中には水溶性

のものは不純物が多いが力価が高いのでそのまま糖化用酵素として利用できるものである。

本発明は、このような未変性グルテンの酸分散液又はプロテアーゼ分解液は従来の活性グルテン及び小麦でん粉の製造設備をそのまま利用できるのもので $\beta$ -アミラーゼ酵素粉末を大量・安価に製造できること及び小麦でん粉も従来通り分取でき、かつ場合によってはグルテンを再び回収することもできるという経済的に有利な方法である。即ち大豆分離蛋白質製造時に副生する $\beta$ -アミラーゼ含有液が約20単位/㎖であるのに対し、未変性グルテンの酸分散液の再破壊（グルテンの再沈でん）によるときの液が28単位/㎖、未変性グルテンのプロテアーゼ処理液が約460単位/㎖、小麦粉に加水してプロテアーゼ処理後遠沈による液が80単位/㎖等の如く、本発明によるものが大豆起源より高濃度のものがえられるから、はるかにその後の精製が容易・低廉となる。

以下実施例をあげ本発明の内容を詳述する。

#### 実施例 1

日清製粉株式会社製の小麦粉青銀杏 500 kg に水 400 ℓ を加え、ニーターで混練しドウを作り 30 分間放置後水洗機に移し、水 4,000 ℓ で水洗し生グルテン 259 kg とでん粉濃度約 6.8 % の粗でん粉乳約 3,700 ℓ を得た。次に水 520 ℓ に酢酸 6.7 ℓ を加え、生グルテン 259 kg を投入しホモゲナイザーで分散した後直ちに噴霧乾燥機で乾燥し  $\beta$ -アミラーゼ活性を有するグルテン粉末 (pH 4.8、 $\beta$ -アミラーゼ力価 1,400 単位/ｇ) 81.5 kg を得た。

#### 実施例 2

実施例 1 と同様に処理して得たグルテン分散液 785 kg に食塩 7.85 kg、リン酸 2 ナトリウム 3.9 kg を加えて分散状態を破壊した。次にこれを遠心分離して液部を分取し、更にケーソー上 25 kg を加えて $\beta$ 過し清澄液 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 28 単位/ml) 490 ℓ を得、噴霧乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ粉末 ( $\beta$ -アミラ

入れ、40℃で5時間反応させて分解液を得、次にケーソー土 15 kg を加えて $\beta$ 過し清澄液 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 460 単位/ml) 130 ℓ を得、これを噴霧乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ粉末 (pH 6.2、 $\beta$ -アミラーゼ力価 2,000 単位/ｇ) 29.4 kg を得た。

#### 実施例 6

実施例 1 と同様に処理して得た生グルテン 259 kg に、オリエンターゼ 30 N (上田化学工業株式会社製中性プロテアーゼ) 0.65 kg を入れ、40℃で5時間反応させて分解液を得、次にケーソー土 15 kg を加えて $\beta$ 過し清澄液 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 460 単位/ml) 130 ℓ を得、これを日東電気工業株式会社製限外 $\beta$ 過濃縮膜 NTU 3520 で 30 ℓ 迄濃縮し、濃縮液を $\beta$ 過後 $\beta$ 液を噴霧乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ粉末 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 4,000 単位/ｇ) 12.8 kg を得た。

#### 実施例 7

日清製粉株式会社製の小麦粉青銀杏 500 kg

-ゼ力価 1,400 単位/ｇ) 23.8 kg を得た。

#### 実施例 3

実施例 2 と同様に処理して得た清澄液 490 ℓ を日東電気工業株式会社製限外 $\beta$ 過濃縮膜 NTU 3520 で 100 ℓ 迄濃縮し、濃縮液を $\beta$ 過後 $\beta$ 液を噴霧乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ粉末 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 3,500 単位/ｇ) 8.2 kg を得た。

#### 実施例 4

実施例 1 と同様に処理して得た生グルテン 259 kg に、オリエンターゼ 30 N (上田化学工業株式会社製中性プロテアーゼ) 0.65 kg を入れ、40℃で5時間反応させて分解液を得、これを真空乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ活性を有する粉末 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 1,400 単位/ｇ) を 80 kg 得た。

#### 実施例 5

実施例 1 と同様に処理して得た生グルテン 259 kg に、オリエンターゼ 30 N (上田化学工業株式会社製中性プロテアーゼ) 0.65 kg を

に水 2,500 ℓ 加え、オリエンターゼ 30 N (上田化学工業株式会社製中性プロテアーゼ) 0.65 kg を入れ 40℃で5時間反応後遠心分離機で不溶部 1,200 kg と液部 1,800 ℓ を得た、液部は更にケーソー土 90 kg 加え $\beta$ 過して清澄液 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 80 単位/ml) 1,650 ℓ とし、これを日東電気工業株式会社製限外 $\beta$ 過濃縮膜 NTU 3520 で 300 ℓ 迄濃縮し、濃縮液を再度 $\beta$ 過後 $\beta$ 液を噴霧乾燥して  $\beta$ -アミラーゼ粉末 ( $\beta$ -アミラーゼ力価 3,800 単位/ｇ) 34.7 kg を得た。

一方、遠心分離で得た不溶部に水 4,500 ℓ を加え、ノズルセパレーターで澱粉乳を分別し以下常法に従って乾燥した所、小麦でん粉 270 kg を得た。

(注)  $\beta$ -アミラーゼ力価測定法

2%可溶性でん粉

(pH 5.5 の 0.02 M 酢酸・酢酸ナトリウム  
緩衝液に溶解)

↓  
← 酵素液  
40℃ 30分

↓  
フーリングレーマン・ショール法で  
ブドウ糖として定量

参考：1単位とは、酵素1グラム当り  
1分間にブドウ糖として1mg生  
成する力価を示す。

特許出願人 グリコ栄養食品株式会社